

УДК 56.893.192.1

**ВЗАИМООТНОШЕНИЯ КОКЦИДИИ *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*  
(ARICOMPLEXA: SPOROZOA) С КЛЕТКАМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ  
ХОЗЯИНА-МЛЕКОПИТАЮЩЕГО**

© Н. В. Свежова

В связи с оппортунистическим характером заболевания, вызываемого *Cryptosporidium parvum*, выяснение места возможного персистирования этого паразита представляет существенный интерес. При электронно-микроскопическом исследовании тощей и подвздошной кишки зараженных *C. parvum* крысят-сосунков обнаружен массовый выход в просвет кишечника иммунокомпетентных клеток хозяина – эозинофилов, нейтрофилов и макрофагов. Отмечены в просвете кишечника и отдельные лимфоциты. Иммунокомпетентные клетки (кроме лимфоцитов) могли при этом содержать фагосомы с различными эндогенными стадиями *C. parvum*. В просвете кишечника были обнаружены также макрофаги, на поверхности которых *C. parvum* образовывал характерные для этого паразита экстрацитоплазматические паразитофорные вакуоли. На поверхности таких макрофагов находились практически все стадии развития криптоспоридий. По-видимому, паразит может не только переживать, но и претерпевать полный цикл своего развития в макрофагах. Однако мы пока не обнаружили в lamina propria кишечных ворсинок ни одного макрофага, содержащего паразита. Не известно также и место заражения макрофагов. Поэтому следует сделать вывод о том, что переживание *C. parvum* в макрофагах является принципиально возможным.

В последнее время кишечные кокцидии рода *Cryptosporidium* стали излюбленным объектом исследований. Причиной тому служит не только необычная экстрацитоплазматическая локализация этих внутриклеточных паразитов, поражающих энтероциты тонкого кишечника, но и отсутствие эффективных методов лечения криптоспориidioза. Последнее особенно важно потому, что криптоспориidioз является оппортунистическим заболеванием и, следовательно, смертельно опасен для больных с различными формами иммунодефицита, в том числе и СПИД. Существует довольно много данных об иммунной реакции хозяина при криптоспориidioзе. Они относятся главным образом к гуморальному ответу или к стимуляции антигеном *Cryptosporidium* размножения тех или иных клеточных популяций in vitro (Havashi, 1993; Aguirre e. a., 1994; Favennec e. a., 1995; Gomez Morales e. a., 1995; Tiley e. a., 1995; Urban e. a., 1996). Об ответе клеток иммунной системы хозяина на клеточном и/или субклеточном (ультраструктурном) уровне имеются лишь отрывочные данные. В этом плане *Cryptosporidium* изучается в рамках клеточного взаимодействия, но лишь со специфическими клетками хозяина: при кишечном криптоспориidioзе – с энтероцитами, при легочном – с альвеоцитами 2-го типа, в почках и матке – с клетками эпителия, несущими на дистальном конце микроворсинки. Таким образом, новым подходом к изучению паразито-

хозяйинных отношений при криптоспориidioзе является выяснение их взаимоотношений с фагоцитами иммунной системы (гранулоцитами и макрофагами).

В связи с накопившимися данными о том, что криптоспориidioз можно рассматривать как оппортунистическую инфекцию (ОИ), возникает вопрос о способности этих паразитов к персистенции, т.е. к длительному переживанию в организме хозяина, без потери инвазионных свойств. Способность к персистенции известна у многих паразитов, а среди возбудителей ОИ протозойной природы этой способностью обладает, например, цистообразующая кокцидия *Toxoplasma gondii* (Бейер, 1989). У *Toxoplasma gondii* эндогенные стадии персистируют в форме тканевых цист во внутренних органах как в промежуточном, так и в окончательном хозяевах. Для такого кишечного кокцидиоза, как криптоспориidioз, образование цист во внутренних органах хозяина не наблюдается, и вопрос о месте и характере персистенции эндогенных стадий развития криптоспориидов до сих пор остается открытым. Начатая нами серия исследований по взаимоотношению криптоспориидов с фагоцитами иммунной системы хозяина служит первым шагом к решению этой проблемы.

В иммунный ответ при криптоспориidioзе вовлечены как клеточный, так и гуморальный механизмы. При криптоспориidioзе наблюдается инфильтрация lamina propria кишечных ворсинок различными иммунными клетками: макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами, эозинофилами и плазматическими клетками (Fayer, Ungar, 1986; Tzipori, 1988; Current, 1989; Martins, Guerrant, 1995).

В крови иммунокомпетентных людей, больных криптоспориidioзом, быстро повышается уровень IgM антител. Короткоживущие молекулы этих антител пентамерны (имеют 5 антиген-распознающих участков), что позволяет им эффективнее связываться с антигеном. Кроме того, они не способны связываться с лимфоидными клетками, а следовательно, могут служить только для опсонизации и последующего захвата фагоцитами или комплемент-зависимого лизиса. Уровень IgM снижается до нормы в течение 4 мес. (Martins, Guerrant, 1995). Позднее по отношению к уровню IgM возрастает уровень IgG, нормализующийся в срок до 12 мес. (Martins, Guerrant, 1995). IgG способны связываться с лимфоидными клетками, и наличие этих антител свидетельствует о формировании иммунологической памяти.

В сыворотке больных криптоспориidioзом наблюдается также и повышение уровня IgA антител (Favennec e. a., 1995), играющих важную роль в секреторном иммунитете слизистых оболочек.

Особого внимания заслуживает сообщение об обнаружении *Cryptosporidium* в цитоплазме М-клеток (microfold cells), лежащих в эпителии подвздошной кишки морских свинок над Пейеровыми бляшками (Marcial, Madara, 1986). Известно, что функция этих своеобразных эпителиальных клеток, лишенных микроворсинок и наделенных повышенной способностью к пиноцитозу, состоит в собирании антигенов (в том числе и микроорганизмов) из просвета кишечника и презентации их лимфоцитам (Горышина, Чага, 1990).

У людей, перенесших криптоспориidioз, повышается уровень гамма интерферона (INF- $\gamma$ ) – мощного индуктора клеточного иммунного ответа (Gomez Morales e. a., 1995). Исследованиями многих авторов показано, что *Cryptosporidium* не способен подавлять иммунный ответ хозяина или избегать его (см.: Current, 1989), т.е. криптоспорииды не способны к молекулярной мимикрии (характерной, например, для трипаносоматид) и к выделению веществ, подавляющих размножение иммунокомпетентных клеток. Однако есть данные и о возможном персистенции *Cryptosporidium* в связи с оппортунистическим характером вызываемого им заболевания. Поэтому целью данного исследования стало выяснение принципиальной возможности выживания паразита в фагоцитах иммунной системы

хозяина, что может послужить основой для дальнейших исследований по выяснению места и характера персистирования криптоспоридий.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Крысят-сосунков в возрасте 7–10 сут заражали ооцистами *Cryptosporidium parvum*, полученными от спонтанно зараженных телят. Ооцисты очищали и концентрировали, используя методику флотации в прерывистом градиенте плотности перколлы (Waldman e. a., 1986; Бейер и др., 1995). Доза заражения составляла  $1-2 \times 10^5$  ооцист на одного крысенка. На 4-е сутки после заражения кусочки зараженной тощей и подвздошной кишки фиксировали в растворе, содержащем 2.5 % глутаральдегида и 2 % параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере, дофиксировали в 1 %-ном растворе  $\text{OsO}_4$ , обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и в окиси пропилена и заливали в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB 200, окрашивали уранил-ацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали при помощи электронного микроскопа JEM 7. Идентификация иммунокомпетентных клеток проводилась с использованием только цитоморфологических признаков.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При электронно-микроскопическом исследовании наблюдалась высокая, достигающая до тотальной, интенсивность заражения *C. parvum* слизистой кишечника крысенка. Зараженный эпителий терял регулярное строение, lamina propria кишечных ворсинок была инфильтрована макрофагами, нейтрофилами, эозинофилами, лимфоцитами и в меньшей степени плазматическими клетками. Но самым удивительным оказалось присутствие иммунокомпетентных клеток в просвете кишечника (рис. 1, 2; см. вкл.). В просвете кишечника встречались как свободные иммунокомпетентные клетки, так и иммунокомпетентные клетки, содержащие *C. parvum*. При этом паразит мог находиться в цитоплазме фагоцитов либо внутри фагосомы, либо образовывал на их поверхности типичную для *Cryptosporidium* экстрацитоплазматическую паразитофорную вакуоль (см. таблицу; рис. 2).

Иммунокомпетентные клетки хозяина,  
встречающиеся в просвете кишечника зараженного  
*C. parvum* крысенка и их взаимоотношения  
с паразитом

Immunocompetent cells of the host occurring  
in the rat intestine infected with *Cryptosporidium*  
*parvum* and their relations with the parasite

Клетки иммун- ной системы	Свободные от паразита	Содержащие <i>C. parvum</i> :	
		в фаго- соме	в пара- зитофор- ной вакуоли
Макрофаги	+	+	+
Лимфоциты	+		
Эозинофилы	+	+	
Нейтрофилы	+	+	

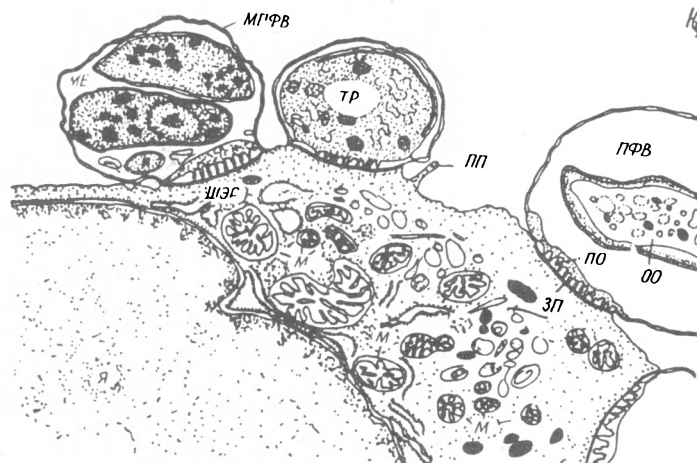


Рис. 3. Тонкое строение участка колонизированного *C. parvum* макрофага из просвета кишечника крысенка.

МЕ — меронт.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1 и 2.

Fig. 3. Fine structure of the macrophage infected with *Cryptosporidium parvum* taken from the rat intestine lumen.

Из таблицы видно, что образование характерной для *Cryptosporidium* экстрацеллюлярной паразитофорной вакуоли наблюдалось только при взаимодействии зоитов *C. parvum* с макрофагами. В то же время в эозинофилах, нейтрофилах и даже в макрофагах можно было видеть эндогенные стадии развития этого паразита внутри фагосом. Зоиты и ооцисты — во всех вышеперечисленных фагоцитах и тонкостенные ооцисты — только в эозинофилах и нейтрофилах.

Выход иммунокомпетентных клеток хозяина в просвет кишечника можно объяснить как разрывом эпителия ворсинок, так и способностью макрофагов встраиваться в эпителий кишки. Разрыв ворсинок часто наблюдается при гиперинвазии *C. parvum* на светоптический уровень (Fayer, Ungar, 1986; Tzipori, 1988; Current, 1989). Мы также часто видели такие „лопнувшие” ворсинки. Способность фагоцитов захватывать криптоспоридий в просвете кишечника представляется новой и очень интересной стороной паразито-хозяйинных отношений. Можно представить себе механизм этого фагоцитирования: опсонизированные кишечными IgA антителами (их выделяют плазматические клетки миндалин и кишечных лимфоидных образований) паразиты становятся доступными для всех способных к фагоцитозу клеток иммунной системы хозяина, какие только смогут прийти с ними в контакт, а так как разрыв ворсинок кишечника характерен только для гиперинвазии, то и массовый выход иммунокомпетентных клеток в просвет кишки — явление достаточно редкое. Более интересна способность криптоспоридий образовывать нормальные паразитофорные вакуоли на макрофагах и, по-видимому, претерпевать полный цикл развития в этих клетках. На поверхности макрофагов в просвете кишечника мы наблюдали практически все стадии жизненного цикла *C. parvum* — трофозоиты, меронты, макрогаметы и ооцисты (рис. 2, 3). Можно предположить, что *Cryptosporidium*, подобно другим споровикам, таким как *Toxoplasma* или *Plasmodium*, способен к переживанию или даже к размножению в макрофагах (Бейер, 1989). Доказательство этого предположения смогло бы пролить свет на проблему персистенции *Cryptosporidium*, однако ни одного макрофага, содер-

жащего паразита, а lamina propria нами пока не было обнаружено. Не известно также и место заражения макрофагов криптоспоридиями.

Полученные предварительные данные позволяют сделать вывод о том, что переживание *C. parvum* в макрофагах является принципиально возможным. Для выяснения деталей этого явления требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, код проекта 95-04-11068.

### Список литературы

- Бейер Т. В. Клеточная биология споровиков – возбудителей протозойных болезней животных и человека. Л.: Наука, 1989. 184 с.
- Бейер Т. В., Сидоренко Н. В., Григорьев М. В. *Cryptosporidium parvum* (Sporozoa, Coccidia, Apicomplexa) – оптимизация техники получения большой массы ооцист // Паразитология. 1995. Т. 29, вып. 3. С. 198–207.
- Горышина Е. Н., Чага О. Ю. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии. Л.: Изд. ЛГУ, 1990. 318 с.
- Aguirre S. A., Mason P. H., Perryman L. E. Susceptibility a major histocompatibility complex (MHC) class 1 and MHC class 2 – deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection // Infection and Immunity. 1994. Vol. 62, N 2. P. 697–699.
- Current W. L. *Cryptosporidium* spp. // Parasitic infection in the Compromised Host. N. Y.: Margel Dekker Inc., 1989. P. 281–341.
- Fayer R., Ungar B. L. P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis // Microbiol. Revs. 1986. Vol. 50. P. 548–483.
- Favennec L., Comby E., Ballet J. J., Brasseur P. Serum IgA antibody response to *Cryptosporidium parvum* is mainly represented by IgA 1 // J. Infect. Dis. 1995. Vol. 171, N 1. P. 256.
- Gomez Morales M. A., Ausiello C. M., Urbani F., Pozio E. Crude extract and recombinant protein of *Cryptosporidium parvum* oocysts induced proliferation of human peripheral blood mononuclear cells in vitro // J. Infect. Dis. 1995. Vol. 172, N 1. P. 211–216.
- Havashi S. Effects of immune rabbit serum and monoclonal antibodies on infectivity of *Cryptosporidium muris* in mice // J. the Osaka City Medical Center. 1993. Vol. 42, N 2. P. 165–189.
- Marcial M. A., Madara J. L. *Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell–parasite membrane–membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M-cells // Gastroenterology. 1986. Vol. 90. P. 583–594.
- Martins C. A. P., Guerrant R. L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis // Parasitology Today. 1995. Vol. 11, N 11. P. 434–436.
- Sreter T., Vargo I., Bekesi L. Effects of bursectomy and thymectomy on the development of resistance to *Cryptosporidium baileyi* in chickens // Parasitol. Res. 1996. Vol. 82, N 2. P. 174–177.
- Tilley M., McDonald V., Bancroft G. J. Resolution of cryptosporidial infection in mice correlates with parasite-specific lymphocyte proliferation associated with both  $T_H1$  and  $T_H2$  cytokine secretion // Parasite Immunology. 1995. Vol. 17, N 9. P. 459–464.
- Tzipori S. Cryptosporidiosis in Perspective // Adv. in Parasitology. 1988. Vol. 27. P. 63–129.
- Urban J. F. Jr., Fayer R., Chen Shen Jue, Gause W. C., Gately M. C., Finkelmann F. D. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum* // J. of Immunology (Baltimore). 1996. Vol. 156, N 1. P. 263–268.

Waldman E., Tzipori S., Forsyth J. R. L. Separation of *Cryptosporidium* sp. oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient // J. Clin. Microbiol. 1986. Vol. 23. P. 199–200.

СПбГУ, 199034;  
Институт цитологии РАН,  
Санкт-Петербург, 194064

Поступила 26.11.1996

RELATIONSHIPS OF THE COCCIDIA *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*  
(APICOMPLEXA: SPOROZOA) WITH IMMUNE SYSTEM CELLS  
IN A MAMMALIAN HOST

N. V. Svezhova

*Key words:* *Cryptosporidium parvum*, mammalian host, immune system cells, macrophage.

SUMMARY

By means of an electron microscopic study of the intestine in young rats infected with *Cryptosporidium parvum* we observed a mass migration of immunocompetent cells of the host (eosinophils, neutrophils and macrophages) into the lumen of intestine. Some lymphocytes were also observed. Immunocompetent cells (except lymphocytes) included inside phagosomes with different endogenic states of *C. parvum*. Macrophages with typical extracytoplasmatic parasitophorous vacuoles formed by *C. parvum* were also observed in the intestine lumen. Almost all stages of *C. parvum* could be observed on a surface of such macrophages. However, we did not find in lamina propria of intestine villi any macrophages with parasites. The place of macrophages infection is unknown. We suggest that surviving of *C. parvum* in macrophages is principally possible.

---

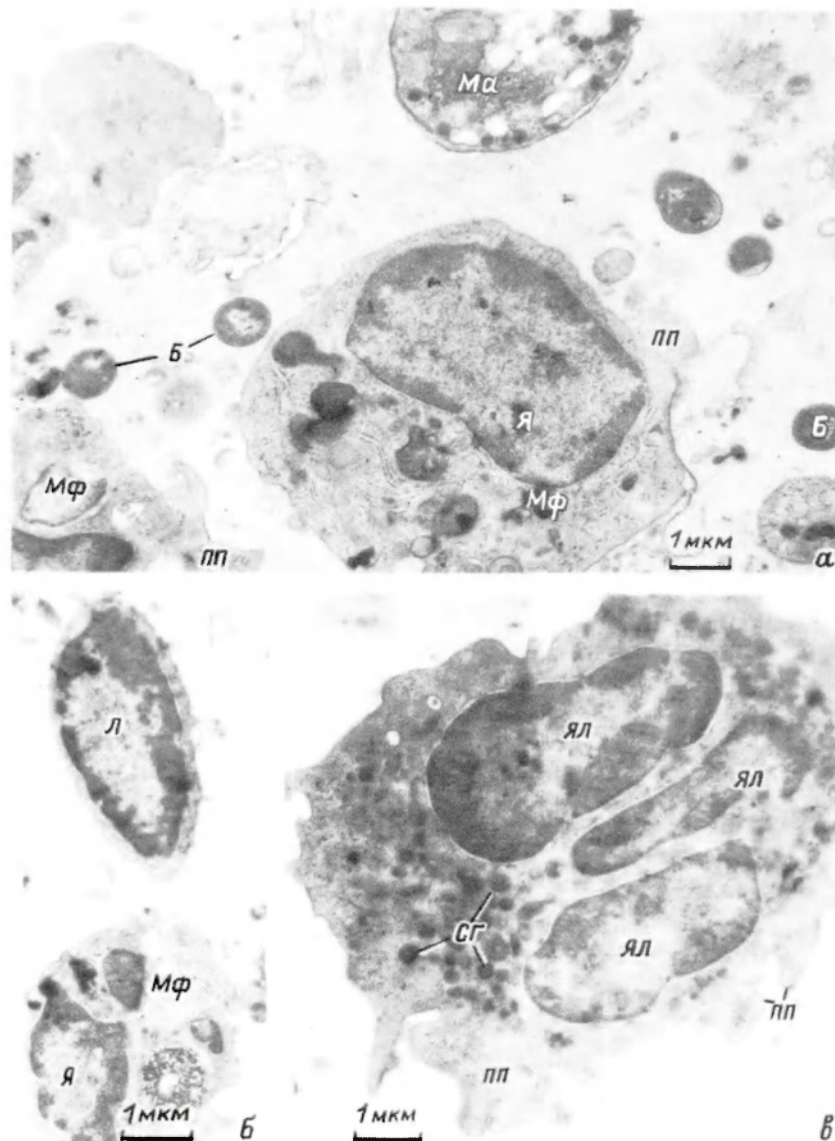


Рис. 1. Иммунокомпетентные клетки в просвете кишечника крысенка, зараженного *Cryptosporidium parvum*.

а — макрофаги и макрогамета; б — макрофаг и лимфоцит; в — нейтрофил; б — бактерия; Ма — макрогамета *Cryptosporidium*; Л — лимфоцит; Мф — макрофаг; пп — псевдоподия, СГ — специфические гранулы; Я — ядро; ЯЛ — ядерные лопасти.

Fig. 1. Immunocompetent cells in the intestine lumen of young rat infected with *Cryptosporidium parvum*.

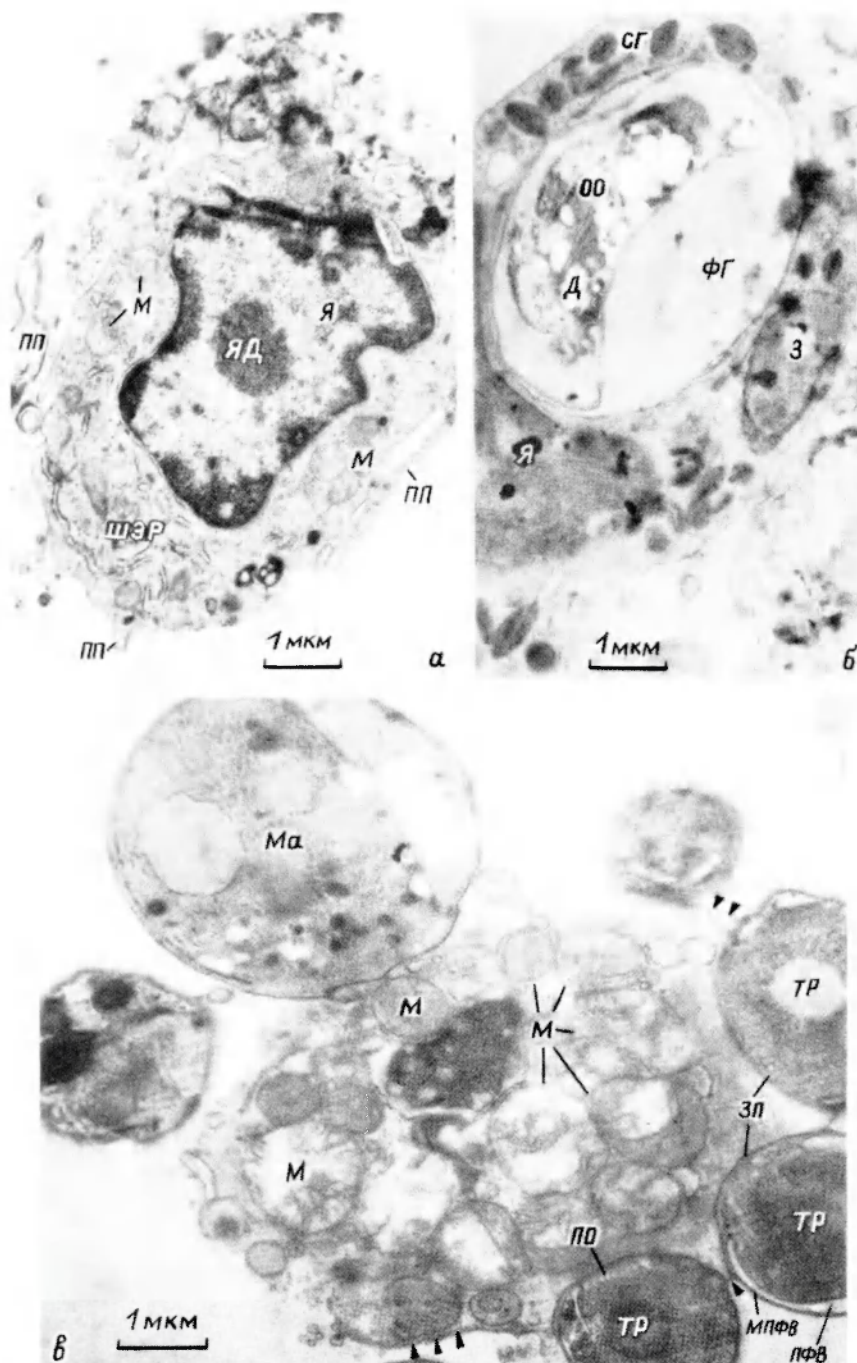


Рис. 2. Иммунокомпетентные клетки в просвете кишечника, содержащие и не содержащие паразитов.

а — макрофаг; б — эозинофил, содержащий в фагосомах тонкостенную ооцисту и зоита; в — колонизированный *S. parvum* макрофаг в просвете кишечника; А — амилопектин; З — зоит; ЗП — зона прикрепления; М — митохондрии; МПФВ — мембрана паразитофорной вакуоли; ОО — ооциста; ПО — питающая органелла; ПФВ — паразитофорная вакуоль; ТР — трофозоит; ФГ — фагосома; шЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум; ЯД — ядрышко; стрелки — мембрана макрофага.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 2. Immunocompetent cells in the intestine lumen with and without parasites.